Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 16, No. 1, Apr. May. 2020, p. 157- 170

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 16، شماره 1،فروردین -اردیبهشت 1399 ص.170-157

کوتاه پژوهشی

مطالعه مقایسه‌ای خصوصیات فیزیکوشیمیایی و رئولوژیکی ژلاتین استخراج شده از پوست فیل ماهی (*Huso huso*) با روش شیمیایی و آنزیمی

زهرا اسکندری[1]- سید علی جعفرپور[2]*

تاریخ دریافت: 1397/09/15
تاریخ پذیرش: 1398/03/19

چکیده

در این پژوهش ژلاتین پوست فیل‌ماهی از طریق روش آنزیمی به کمک آنزیم پپسین استخراج شد و برخی از خصوصیات فیزیکوشیمیایی و رئولوژیکی آن با ژلاتین استخراج‌شده از پوست فیل‌ماهی به روش شیمیایی مقایسه گردید. اثر سه متغیر مستقل دما در سه سطح 30، 40 و 50 درجه سانتی‌گراد، آنزیم در سه سطح 0/01%، 0/055% و 0/1% وزنی- وزنی و pH در سه سطح 2، 3 و 4 بر متغییر وابسته از قبیل تعیین وزن مولکولی (SDS-PAGE) و طیف‌سنجی مادون‌قرمز (FTIR) و رفتارهای رئولوژیکی بررسی شد. در این پژوهش نمونه تیمار شده در دمای 30 درجه سانتی‌گراد، نسبت آنزیم 0/1% و pH=4 (تیمار 5) با 2466/36 گرم دارای بیشترین قدرت ژل، نمونه تیمار شده در دمای 40 درجه سانتی‌گراد، نسبت آنزیم 0/055% و pH=3 (تیمار 17) به‌عنوان نمونه مرکزی با قدرت ژل 909/92 گرم و نمونه تیمار شده در دمای 50 درجه سانتی‌گراد، نسبت آنزیم 0/01% و pH=2 (تیمار 19) با قدرت ژل 483/08 دارای کمترین میزان قدرت ژل بود، جهت بررسی متغییرهای وابسته توسط نرم‌افزار انتخاب شد. بر اساس نتایج SDS-PAGE، ژلاتین استخراج‌شده به روش آنزیمی (تیمار 5) زنجیره‌های α_1 و α_2 و پلیمرهایی با وزن مولکولی بالا همچون ترکیبات β نسبت به تیمار شیمیایی دارای باندهایی با وضوح بهتر بود. در بررسی آزمون FTIR ساختار مارپیچ سه‌گانه ژلاتین استخراج‌شده به کمک آنزیم و ژلاتین استخراج‌شده به روش شیمیایی شدت و تغییر مکان برخی از پیک‌ها جذب نسبتاً مشابهی داشتند. رفتارهای جریانی در تیمار 5 نسبت به نمونه تهیه‌شده به روش شیمیایی نشان‌دهنده افزایش نقطه ذوب و نقطه بستن ژل و ویسکوزیته ظاهری در تمامی نرخ‌های برشی بود.

واژه‌های کلیدی: استخراج آنزیمی، ژلاتین، فیل‌ماهی، SDS-PAGE، FTIR، رفتارهای رئولوژیکی

مقدمه

ژلاتین یک پروتئین رشته‌ای اصلی در استخوان‌ها، غضروف و پوست و قابل‌حل در آب است که توسط هیدرولیز جزئی از کلاژن به دست می‌آید. کیفیت ژلاتین استحصالی خود تابع متغیرهای زیادی است و منبع، سن حیوان و نوع کلاژن بر خواص ژلاتین اثرگذار است (Bailey *et al.*, 1998). این ماده قابلیت تولید ژل، خاصیت چسبندگی، شفاف‌کنندگی و قوام‌دهندگی دارد (Gilsenan and Ross-Murphy, 2000)، و به جهت خواص بی‌نظیر شیمیایی و فیزیکی کاربرد گسترده‌ای در صنایع غذایی و دارویی دارد (Yang *et al.*, 2007). ژلاتین تهیه‌شده از رشته‌های کلاژن، قابلیت هضم بالایی دارد و از آن‌جایی که، بدون کلسترول، چربی و کربوهیدرات است اثرات مثبت ویژه‌ای بر سلامت انسان دارد.

ژلاتین یکی از مورد توجه‌ترین بیوپلیمرهای طبیعی است، که عمدتاً از پوست خوک تولید می‌شود. این منبع حدود 46% از ژلاتین تولیدی سالانه دنیا را در برمی‌گیرد پس‌ازآن پوست گاو (29/4%) و استخوان گاو قرار دارد. اگرچه ژلاتین دام به اشکال مختلف و در ابعاد وسیع مصرف جهانی دارد، (Asher, 1999)، اما از سوی دیگر استفاده از آن به دلیل عقاید مذهبی (ممنوعیت مصرف هرگونه فرآورده مرتبط با گاو نزد هندوها و خوک در اسلام و یهودیت) و نیز شیوه‌های خاص زندگی مانند گیاه‌خواری با محدودیت‌هایی روبرو است. بنابراین تلاش برای یافتن منابع جایگزین مناسب برای محصولات غذایی در حال افزایش است. ژلاتین ماهی یکی از مناسب‌ترین جایگزین‌های ژلاتین پستانداران است که به‌عنوان غذایی حلال پذیرفته شده است. ژلاتین ماهی با ژلاتین پستانداران ازنظر ترکیب‌های مختلف اسیدآمینه به‌خصوص پرولین و هیدروکسی پرولین متفاوت بوده و این امر منجر

1 و 2- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی‌ارشد و دانشیار، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
(* - نویسنده مسئول: Email: a.jafarpour@sanru.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v16i1.76991

به بروز خواصی متفاوت از قبیل دمای ژله‌ای شدن، نقطه ذوب و قدرت ژل می‌شود. به‌منظور برطرف کردن یا کاهش برخی از مشکلات مرتبط با ژلاتین ماهی، راه‌کارهایی مانند استفاده از آنزیم برای استخراج، جهت بهبود استحکام و خصوصیات ژلاتین استخراج‌شده پیشنهاد شده است (Tong and Ying, 2013). آنزیم پپسین حیوانی (EC 3 ،4 ،23 ،2) یک پروتئازهای آسپارتیکی مهم در هیدرولیز پروتئین‌ها و با ویژگی‌های منحصربه‌فرد در برنامه‌های کاربردی صنعتی و تحقیقات پزشکی است (Zhao *et al*., 2011). پپسین در استخراج کلاژن (Nalinanon *et al*., 2007) و استخراج ژلاتین (Nalinanon *et al*., 2008) به‌کار می‌رود.

با توجه به تحقیقاتی که صورت گرفته است، فیل‌ماهی دارای پوستی با منبع غنی از ژلاتین است (مجتهدی و همکاران، 1392؛ مرتضوی و همکاران، 1387). بنابراین می‌توان از پوست آن یک ماده با ارزش همانند ژلاتین با کمک آنزیم پپسین تولید کرد و خواص بافتی آن را بهبود و ارتقا بخشید تا به‌صورت گسترده‌تر مورد استفاده قرار بگیرد. هدف از این مطالعه استخراج ژلاتین از پوست فیل‌ماهی خاویاری به کمک آنزیم پپسین و سپس بررسی اثر آنزیم بر بهبود خواص بافتی ژلاتین و ویژگی‌های عملکردی آن نسبت به ژلاتین استخراج‌شده به روش شیمیایی است.

مواد و روش‌ها

مواد مصرفی شامل سدیم کلرید، آنزیم پپسین (تایتراکم، ایران)، سدیم کربنات، هیدروکلریک اسید 37%، سدیم هیدروکسید (مرک آلمان)، پلی‌آکریل‌آمید، متانول، استیک اسید، گلیسین، بتا مرکاپتو اتانول، پتاسیم برمید، SDS, Tris-Hcl, Dye-Glycerol, Commassie Blue G-250 می‌باشد.

پیش‌فراوری و استخراج ژلاتین و اعمال فاکتورها

تهیه پوست و آماده‌سازی نمونه: آماده‌سازی پوست به روش Feng و همکارانش (2013) انجام شد. پوست فیل‌ماهی خاویاری (*Huso huso*) پرورشی با همکاری اداره شیلات استان مازندران از استخر پرورش ماهیان خاویاری واقع در شهرستان بابلسر بخش بهنمیر روستای میرود در شهریور ماه 1396 تهیه گردید و در یونولیت حاوی یخ به محل آزمایشگاه پایلوت فراوری محصولات شیلاتی دانشگاه منابع طبیعی و علوم کشاورزی ساری انتقال داده شد. محلول 3/5% نمک طعام، جهت حذف پروتئین‌های غیرکلاژنی، و محلول 0/5% سدیم کربنات، جهت حذف چربی از پوست استفاده گردید. در ابتدا پوست‌ها با محلول 3/5% سدیم کلرید به نسبت 1 :10 وزنی- حجمی مخلوط گردید. سپس مخلوط با سرعت 180 دور در دقیقه به مدت 6 ساعت به‌صورت مداوم همزده شد و هر 3 ساعت محلول تعویض شد.

در مرحله بعد، مخلوط پوست و سدیم کلرید را از صافی گذرانده و شست‌وشو داده شد. سپس پوست‌ها با آب مقطر با نسبت 1 :10 وزنی- حجمی با محلول 0/5% سدیم کربنات مخلوط گردید. پس از آن مخلوط با سرعت 180 دور در دقیقه به مدت 6 ساعت به‌صورت مداوم هم زده شد و هر 3 ساعت محلول عوض شد. در انتها پوست‌ها با آب مقطر شسته شده و فرآیند استخراج انجام شد. استخراج به روش تانگ و همکارانش، (2013) با اندکی تغییر در مراحل استخراج انجام شد. استخراج ژلاتین با افزودن پوست پیش تیمار شده همراه با آب مقطر به نسبت (1:2/8) وزنی- حجمی در دماهای (30، 40 و 50) درجه سانتی‌گراد، درصد آنزیم (0/01، 0/055 و 0/1) وزنی- وزنی و pH (2، 3 و 4) به مدت 6 ساعت و 45 دقیقه در حمام آب گرم (Fan azma gostar, Iran) انجام شد به‌منظور تنظیم pH مناسب جهت فعالیت آنزیم در طول مدت استخراج هر 30 دقیقه یک‌بار pH توسط pHمتر (CB 16 NW، انگلیس) اندازه‌گیری شد و برای رساندن آن به مقدار موردنظر از هیدروکلریک اسید و سدیم هیدروکسید 1 نرمال استفاده شد. پس از پایان استخراج مخلوط در حمام آب جوش به مدت 5 دقیقه برای غیرفعال کردن آنزیم‌ها قرار گرفت و از پارچه تنظیف عبور داده شد.محلول صاف‌شده با سرعت 3500 دور در دقیقه به مدت 20 دقیقه به‌منظور خالص‌سازی سانتریفوژ (Universal Centrifuge، ایران) شد و درنهایت توسط خشک‌کن انجمادی (operon, FDU-8624، کره جنوبی) خشک گردید. برای این منظور محلول ژلاتین در ظروف یک‌بارمصرف ریخته شدند، ابتدا در قسمت فریزر یخچال معمولی در دمای 18- قرار گرفتند، بعد از منجمد شدن نمونه‌ها، در داخل اتاقک خشک‌کن انجمادی در دمای 85- درجه سلسیوس قرار داده شدند تا فرآیند خشک شدن تحت خلأ را سپری نمایند. درنهایت پودر لیوفیلیزه شده که به‌عنوان ژلاتین پوست فیل‌ماهی هستند، تهیه شد. پودرهای تولیدشده در کیسه‌های پلاستیکی در فریزر در دمای 18- درجه سانتی‌گراد تا زمان ارزیابی ویژگی‌های آن‌ها نگهداری شدند.

تخمین وزن مولکولی با روش سدیم دودسیل سولفات پلی‌آکریل‌آمید ژل (SDS-PAGE)

اندازه‌گیری وزن مولکولی به روش Laemmli (1970) انجام شد. نمونه‌های ژلاتین به مقدار 5 mg/ml در آب مقطر با دمای 60 درجه سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه حل شدند . بافر حاوی20% بتا مرکاپتو اتانول اضافه شد. پس از دناتوره شدن در دمای 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه، نمونه‌های ژلاتین (20 میکروگرم) توسط SDS-PAGE با استفاده از 10% ژل حل‌شده و 5% ژل انباشته‌شده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. باندهای پروتئینی با استفاده از Coomassie Brilliant Blue G-250 رنگ‌آمیزی شدند. لدر مورد

استفاده در این پژوهش GeneDirex و محدوده وزن مولکولی آن از 6/5 تا 270 کیلودالتون بود.

جدول 1- سطوح متغییرهای آزمایشی جهت استخراج ژلاتین از پوست فیل‌ماهی

نوع متغییر	نماد	سطوح کدبندی‌شده		
		+1	0	-1
دما (c °)	A	50	40	30
نسبت آنزیم (w/w)	B	0/1	0/055	0/01
pH	C	4	3	2

جدول 2- تیماردهی تصادفی آزمایش بهینه‌سازی فاکتورها و شرایط ترتیبی مورداستفاده در فرآیند استخراج آنزیمی ژلاتین از پوست فیل‌ماهی

تیمار	دما (°c)	نسبت آنزیم (٪)	pH
1	40	0/1	3
2	30	0/01	2
3	50	0/1	4
4	50	0/055	3
5	30	0/1	4
6	40	0/055	3
7	50	0/01	4
8	30	0/01	4
9	40	0/055	3
10	40	0/055	2
11	30	0/1	2
12	40	0/055	3
13	40	0/055	3
14	50	0/1	2
15	40	0/055	3
16	30	0/055	3
17	40	0/055	3
18	40	0/055	4
19	50	0/01	2
20	40	0/01	3
شیمیایی	75	صفر	صفر

طیف‌سنجی مادون‌قرمز (FTIR)

طیف‌های FTIR مطابق روش Al-Saidi و همکاران (2012) تهیه شد. طیف FTIR از دیسک‌های حاوی10 میلی‌گرم نمونه خشک‌شده (میزان رطوبت: 16 گرم در 100 گرم نمونه) در حدود 90 میلی‌گرم برمید پتاسیم (KBr) به دست آمد.

رفتارهای رئولوژیکی

به‌منظور توصیف ویژگی‌های رفتاری رئولوژیکی (همچون ویسکوزیته و نقطه ذوب و بستن ژل در روبش دمایی) از روش Norziah و همکاران (2009) استفاده شد. بدین منظور از رئومتر تنشی کنترلی صفحه- صفحه (40 میلی‌متر، زاویه: 2 درجه و گپ: 52 میلی میکرون)، پس از خارج شدن نمونه‌ها از حمام آب گرم استفاده گردید. ویژگی‌های ویسکوالاستیک محلول ژلاتینی (3 درصد وزنی/ حجمی) در محدوده 5 تا 50 درجه سانتی‌گراد (روبش گرمایشی) و 50 تا 5 درجه سانتی‌گراد (روبش سرمایشی) با نرخ گرمایشی/ سرمایشی 1 درجه سانتی‌گراد بر دقیقه اندازه‌گیری شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

در این پژوهش به‌منظور بهینه‌سازی تیمارهای آزمایشی از طرح آماری روش سطح پاسخ (RSM) استفاده شد. به‌منظور بهینه‌یابی فرآیند استخراج آنزیمی ژلاتین از طرح مرکب مرکزی استفاده شد. بهینه‌سازی بر اساس قدرت ژل به‌عنوان شاخص در نظر گرفته شد. اثر متغیرهای مستقل شامل دما (۳۰،۴۰ و 50 درجه سانتی‌گراد)، نسبت آنزیم(w/w %0/01، 0/055% و 0/1%) و pH (2، 3 و 4) در 3 سطح مورد ارزیابی قرار گرفت. مدل به‌دست‌آمده برای هر پاسخ بر اساس آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA آزمون شد. جهت طراحی آزمایش، آنالیز نتایج، رسم نمودارها و بهینه‌یابی از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت (نسخه 7) استفاده شد. شاخص‌های اندازه‌گیری شده بر طبق معادله 1 مدل‌سازی شدند.

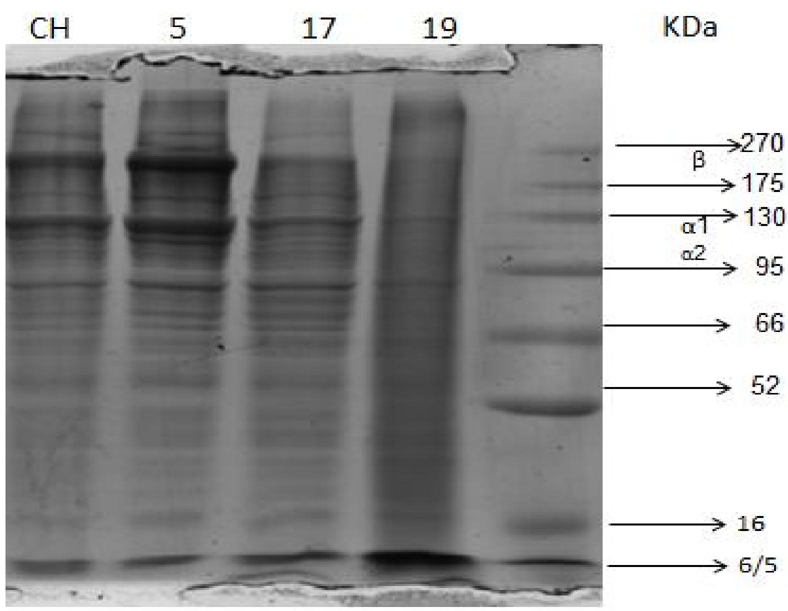
$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{3} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j} \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Y عبارت است از متغیر وابسته ، β_0 ، β_i ، β_{ii} و β_{Ij} ثابت‌های برآورد شده توسط مدل، X_i وX_j سطح متغیرهای مستقل بوده و آن‌ها به ترتیب نمایانگر اثرات خطی، درجه دوم و اثرات متقابل متغیرهای X_1 ، X_2 و X_3 روی پاسخ می‌باشند

نتایج و بحث

تعیین وزن مولکولی پروتئین با استفاده از تکنیک پلی‌آکریل‌آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE)

الگوی پروتئین ژلاتین استخراج‌شده از پوست فیل‌ماهی توسط آنزیم پپسین (تیمار 5، 17 و 19) در مقایسه با نمونه ژلاتین استخراج‌شده از پوست فیل‌ماهی به روش شیمیایی در شکل 1 نشان داده شده است. زنجیره‌های α1 به‌طور واضح در نمونه استخراج‌شده به کمک آنزیم قابل مشاهده است که حدوداً 130 کیلودالتون می‌باشد (تیمار 5). زنجیره α2 در ژلاتین استخراج‌شده به روش شیمیایی نسبتاً ضعیف‌تر نشان داده شده است. زنجیره‌های با وزن مولکولی کمتر از 130 کیلودالتون در نمونه شیمیایی و همچنین در نمونه استخراج‌شده به روش آنزیمی با کاهش نسبت آنزیم به‌تدریج ناپدید شد (تیمار 19).



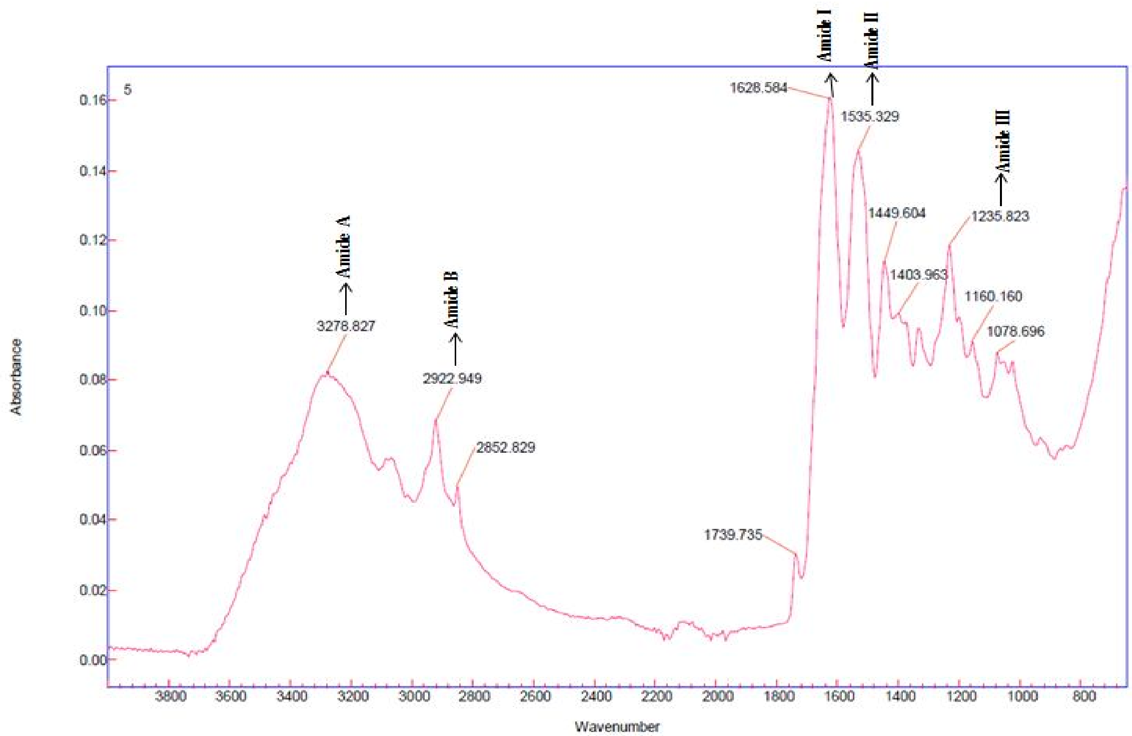
شکل1- الگوی الکتروفورز نمونه‌های ژلاتین با نسبت آنزیم 0/1% وزنی- وزنی (تیمار 5)، نمونه تهیه‌شده با نسبت آنزیم 0/055% وزنی- وزنی (تیمار 17) و نمونه تهیه‌شده با نسبت آنزیم 0/01% وزنی- وزنی (19)، نمونه تهیه‌شده به روش شیمیایی (CH)- مارکر (راست)

ژلاتین استخراج‌شده به روش آنزیمی حاوی زنجیره‌های α1 و α2 می‌باشد. در مقدار متوسط آنزیم (تیمار 17) زنجیره‌های α2 به‌طور نسبتاً ضعیف‌تری نسبت به مقدار بیشینه آنزیم (تیمار 5) مشاهده شده است و این زنجیره‌ها در مقدار کمینه آنزیم (تیمار 19) تقریباً محو شده است. این زنجیره‌ها در ژلاتین استخراج‌شده به روش شیمیایی نسبت به تیمار 5 نیز ضعیف‌تر است علاوه بر این می‌توان مشاهده کرد که در ژلاتین استخراج‌شده به روش آنزیمی نسبت زنجیره α2 /α1 حدود 2 است (نسبت ذاتی در کلاژن I)، که نشان می‌دهد ساختار ذاتی ژلاتین حفظ شده است. پلیمرها با وزن مولکولی بالا همچون ترکیبات β با وزن مولکولی 270 کیلودالتون که حاصل پایداری حرارتی

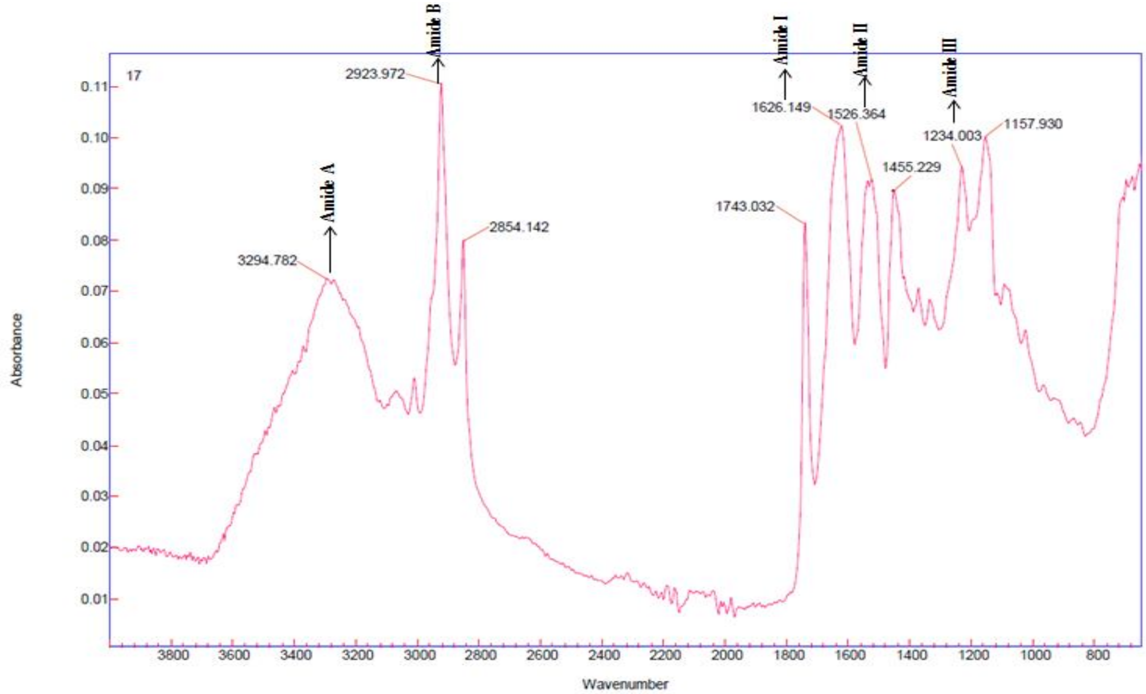
باندهای حفظ‌شده در استخراج آنزیمی است، نسبت به نمونه استخراج‌شده به روش شیمیایی به‌طور واضح‌تری قابل مشاهده می‌باشد، همان‌طور که باندهای با تراکم بیشتر در بالای ژل پلی‌آکریل‌آمید تائیدکننده این مطلب می‌باشد (تیمار 5). همچنین پپتیدها با وزن مولکولی پایین در ژلاتین استخراج‌شده به روش آنزیمی مشاهده شد، که می‌تواند به علت شکسته شدن جزئی ژلاتین در طول تورم توسط پپسین باشد (تیمار 5 و 17). این نتایج با مشاهدات Jridi و همکاران (2015)، که نشان دادند پپتیدهای با وزن مولکولی کم در ژلاتین استخراج‌شده توسط پپسین از ماهی مرکب (*Octopus vulgaris*) درصد کمی دارند، مطابقت دارد. به‌طورکلی استخراج آنزیمی بر طول زنجیره پلی‌پپتیدی و خواص عملکردی ژلاتین تأثیر دارد و منجر به حفظ ساختار مارپیچ سه‌گانه ژلاتین نهایی می‌شود. Feng و همکاران (2013) در بهینه‌سازی استخراج و خصوصیات کلاژن تهیه‌شده از پوست ماهی خاویار چینی (*Acipenser sturio Linnaeus*) به کمک آنزیم مشاهده کردند که الگوهای ژل الکتروفورز پوست ماهی خاویار به دلیل استفاده از آنزیم برای استخراج حاوی کلاژن نوع I است که از زنجیره α و زنجیره β ساخته شده است. با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر می‌توان بیان داشت که استخراج آنزیمی ژلاتین در مقایسه با روش شیمیایی استخراج می‌تواند به‌طور مؤثرتری منجر به حفظ خصوصیات کیفی ژلاتین استخراجی گردد.

آنالیز طیف‌سنجی مادون‌قرمز (FTIR)

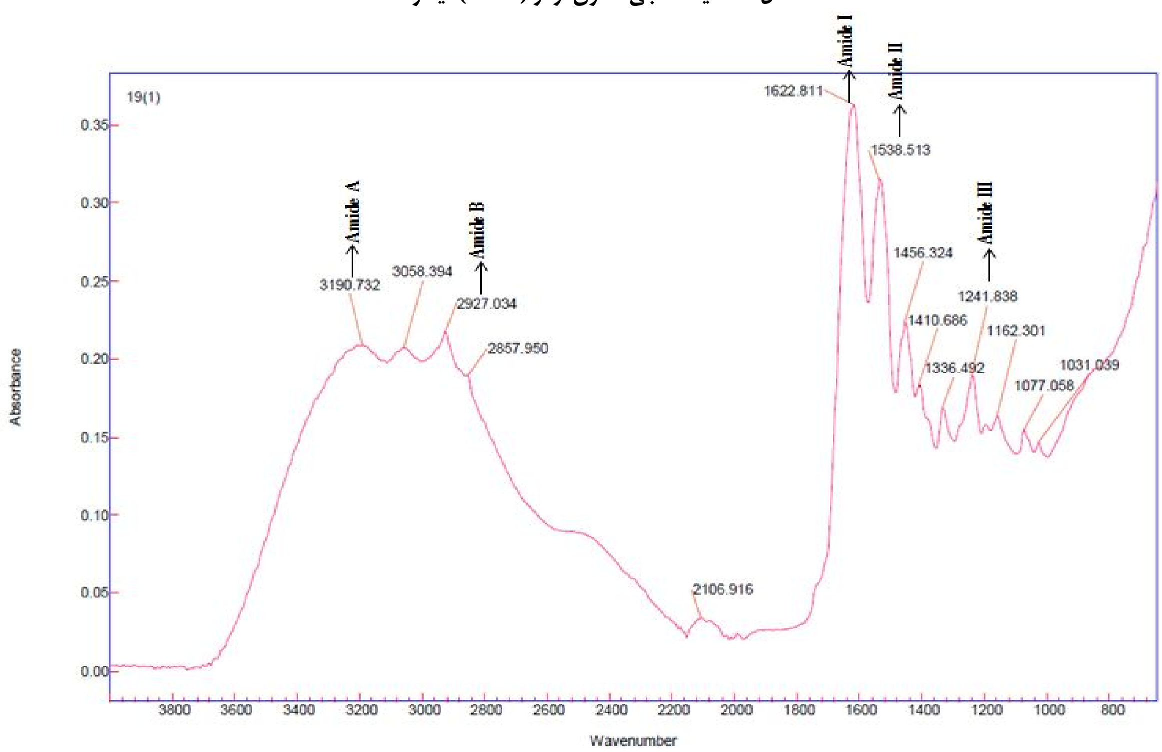
نتایج حاصل از اندازه‌گیری طیف‌سنجی مادون‌قرمز ژلاتین استخراج‌شده در شکل‌های 2، 3، 4 و 5 آورده شده است. نوارهای جذبی در منطقه آمید ازجمله باند آمید A، آمید I، آمید II، آمید III و آمید B بررسی گردید. بیشترین و کمترین میزان طول‌موج آمید A مربوط به تیمار 17 و تیمار 19، بیشترین و کمترین میزان طول‌موج آمید I مربوط به تیمار 5 و تیمار 19، بیشترین و کمترین میزان طول‌موج آمید II مربوط به تیمارهای استخراج‌شده به روش شیمیایی و تیمار 17، بیشترین و کمترین میزان نسبت آمید III به آمید 1454 (Amide III/Amide 1454) مربوط به تیمار 5 و 19 می‌باشد و بیشترین و کمترین میزان طول‌موج آمید B مربوط به تیمار 19 و 5 می‌باشد.



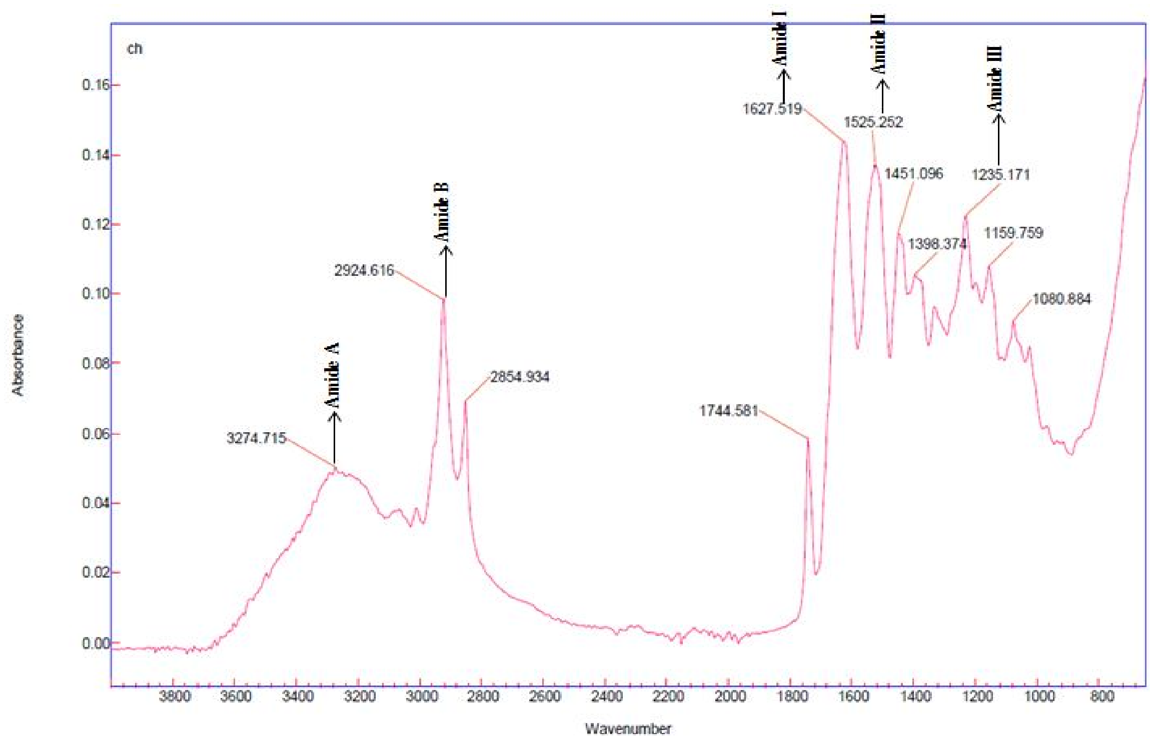
شکل 2- طیف‌سنجی مادون‌قرمز (FTIR) تیمار 5



شکل 3- طیف‌سنجی مادون‌قرمز (FTIR) تیمار 17



شکل 4- طیف‌سنجی مادون‌قرمز (FTIR) تیمار 19



شکل 5- طیف‌سنجی مادون‌قرمز (FTIR) تیمار شیمیایی

نوارهای جذبی در منطقه آمید ازجمله باند آمید A، آمید I، آمید II، آمید III و آمید B، که مربوط به درجه نظم مولکولی و درگیری با ساختار مارپیچ سه‌گانه هلیکس کلاژن هستند، به ترتیب مربوط به ارتعاش کششی N-H، ارتعاش کششی C=O (Benjakul *et al*., 2009)، ارتعاش خمشی N-H به همراه ارتعاش کششی C-N، (Ahmad *et al*., 2010)، ترکیب پیک‌های بین ارتعاش کششی CN و تغییر شکل NH در خمیدگی سطح توسط پیوندهای آمیدی و همچنین جذب ناشی از ارتعاش جنبانه‌ای توسط گروه‌های CH_2 اسکلت گلایسین و زنجیره‌های جانبی پرولین، (Plepis *et al*., 1996) و کشش نامتقارن CH_2 (Abe and krimm, 1972) هستند.

پیک جذب آمید A در محدوده $3400-3440\ cm^{-1}$ اتفاق می‌افتد (Sai and Babu, 2001). پیک‌های جذب آمید A در این مطالعه به ترتیب برای تیمارهای 5 (شکل 2)، 17 (شکل 3) ، 19 (شکل 4) و نمونه تهیه‌شده به روش شیمیایی (شکل 5) در طول موج‌های $3278/827\ cm^{-1}$، $3278/782\ cm^{-1}$، $3294/782\ cm^{-1}$ و $3274/715\ cm^{-1}$ مشاهده گردید. زمانی که گروه NH یک پپتید در پیوند هیدروژنی شرکت کرده است، وضعیت باند آمید A به یک طول‌موج کمتر، حدود $3300\ cm^{-1}$ تغییر خواهد کرد (Doyle *et al*, 1975). جابجایی به فرکانس‌های پایین برای ژلاتین استخراج‌شده با شرایط مختلف ممکن است به تخریب ژلاتین و واکنش گروه آمین آزاد ژلاتین تخریب‌شده با سایر گروه‌های واکنشی مرتبط باشد، درنتیجه این امر باعث کاهش طول‌موج آمید A می‌شود (Benjakul *et al*, 2009). در مطالعه‌ای که Matmaroh و همکارانش (2011)، خصوصیات کلاژن محلول در اسید (ASC) و کلاژن محلول در پپسین (PSC) تهیه‌شده از بزماهی طلائی خال‌دار (*Parupeneus heptacanthus*) را بررسی کردند، پیک آمید A برای ASC و PSC به ترتیب در طول‌موج‌های $3269\ cm^{-1}$ و 3294 مشاهده شد.

پیک جذب آمید B در محدوده $2922\ cm^{-1}$ اتفاق می‌افتد (Feng *et al*, 2013). پیک‌های جذب آمید B در این مطالعه به ترتیب برای تیمارهای 5 (شکل 2)، 17(شکل 3)، 19 (شکل 4) و نمونه تهیه‌شده به روش شیمیایی در طول‌موج‌های: $2922/949\ cm^{-1}$، 2923/972، 2927/034 و 2924/616 یافت شدند. در مطالعه Feng و همکاران (2013) که در رابطه با بهینه‌سازی استخراج و خصوصیات کلاژن تهیه‌شده از پوست ماهی خاویاری چینی (*Acipenser sturio Linnaeus*) به کمک آنزیم صورت گرفت، پیک آمید B در طول‌موج $2920 - 2922\ cm^{-1}$ یافت شد.

پیک جذب آمید I در محدوده $1600 - 1700\ cm^{-1}$ اتفاق می‌افتد (Payne and Veis, 1988). پیک آمید I با ارتعاش کششی C=O یا پیوند هیدروژنی به‌واسطه -COO همراه است. این باند برای تجزیه‌وتحلیل اسپکتروسکوپی مادون‌قرمز ساختار ثانویه پروتئین‌ها مفیدتر می‌باشد (Feng *et al*., 2013). پیک‌های جذب آمید I در این مطالعه به‌ترتیب برای تیمارهای 5 (شکل 2)، 17 (شکل 3)، 19

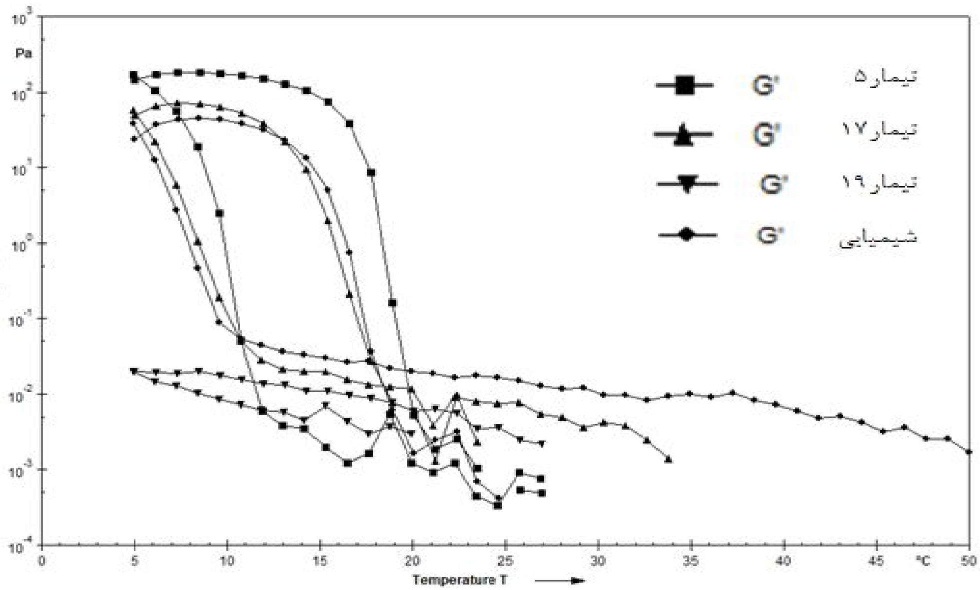
(شکل 4) و نمونه تهیه‌شده به روش شیمیایی (شکل 5) در طول موج‌های $1628/584\ cm^{-1}$، $1626/149\ cm^{-1}$، $1622/811\ cm^{-1}$ و $1627/519\ cm^{-1}$ یافت شدند. بالاتر بودن طول‌موج آمید I، به معنای واکنش بیشتر C=O با زنجیره‌های مجاور از طریق پیوند هیدروژنی شکل گرفته است (تیمار 5 نسبت به تیمار شیمیایی). به‌طورکلی، طول‌موج پایین‌تر باندها مربوط به پتانسیل بالای پیوند هیدروژنی است (Li *et al*., 2004). در مطالعه Kittiphattanabawon و همکاران (2010) که در رابطه با کلاژن کوسه بمبک قهوه‌ای مایل به زرد (*Chiloscyllium punctatum*) صورت گرفت، پیک آمید I به ترتیب برای ASC و PSC در طول‌موج‌های $1631\ cm^{-1}$ و 1635 یافت شد.

پیک جذب آمید II معمولاً در محدوده $1600 - 1550\ cm^{-1}$ رخ می‌دهد، و تغییر به طول‌موج‌های پایین‌تر نشان‌دهنده وجود باندهای هیدروژنی است (Ahmad *et al*., 2010). پیک‌های جذب آمید II در این مطالعه به ترتیب برای تیمارهای 5 (شکل 2)، 17 (شکل 3) ، 19 (شکل 4) و نمونه تهیه‌شده به روش شیمیایی (شکل 5) در طول موج‌های $1535/329\ cm^{-1}$، $1526/364\ cm^{-1}$، $1538/513\ cm^{-1}$و $1525/252\ cm^{-1}$ مشاهده شد. در مطالعه Feng و همکاران (2013) که در رابطه با بهینه‌سازی استخراج و خصوصیات کلاژن تهیه‌شده از پوست ماهی خاویاری چینی (*Acipenser sturio Linnaeus*) به کمک آنزیم صورت گرفت، پیک آمید II در طول‌موج $1536\text{-}1544\ cm^{-1}$ گزارش شد.

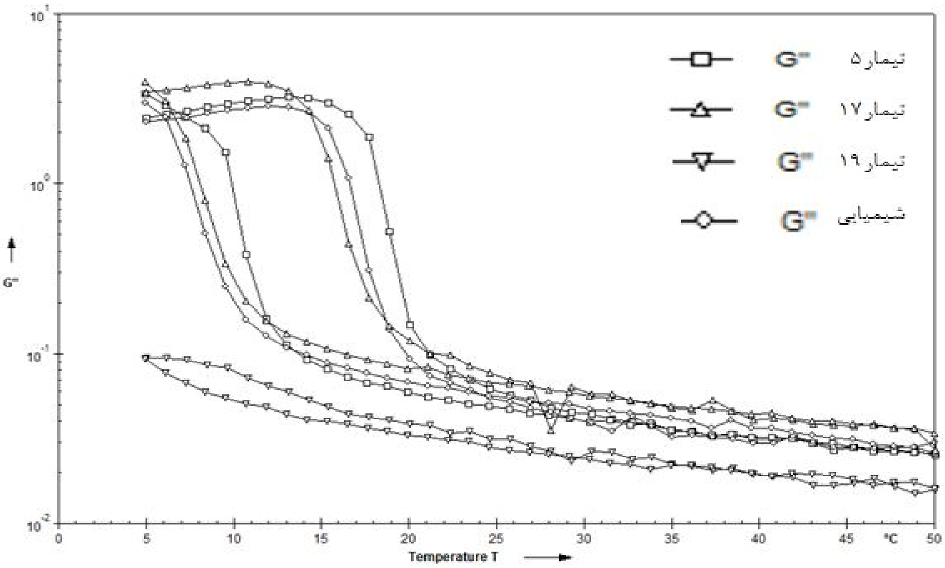
پیک آمید III ترکیب پیک‌های بین ارتعاش کششی CN و تغییر شکل NH در خمیدگی سطح توسط پیوندهای آمیدی و همچنین جذب ناشی از ارتعاش جنبانه‌ای توسط گروه‌های CH_2 اسکلت گلایسین و زنجیره‌های جانبی پرولین است (Plepis *et al*., 1996). بنا به گزارش Kittiphattanabawon و همکاران (2010) نسبت آمید III به آمید 1454 (Amide III/Amide 1454) یک شاخص اندازه‌گیری برای حفظ یکپارچگی ساختار مارپیچ سه‌گانه کلاژن است که باید بالاتر یا برابر با 1 باشد. شاخص‌های پایین‌تر نشان‌دهنده دناتوراسیون می‌باشد. در مطالعه حاضر این نسبت به‌ترتیب برای تیمارهای 5 (شکل 2)، 17 (شکل 3) ، 19 (شکل 4) و نمونه تهیه‌شده به روش شیمیایی (شکل 5): 1/06، 1/05، 0/85و 1/04 بود. ساختار سه‌گانه هلیکس ژلاتین استخراج‌شده به کمک آنزیم (تیمار 5 و 17) و ژلاتین استخراج‌شده به روش شیمیایی به دلیل اینکه نسبت جذب مشابهی بین بیشترین پیک آمید III و پیک آمید 1454 را نشان دادند، مشابه بودند (به ترتیب برای تیمار 5، 17 و شیمیایی: 1/06، 1/05 و 1/04). شاخص‌هایی که تقریباً 1 است، تائید می‌کند که مارپیچ هلیکس هر دو ژلاتین استخراج‌شده به روش شیمیایی و استخراج‌شده به کمک پپسین هنوز وجود داشت و بخش زیادی از ساختار بین‌مولکولی هنوز حفظ شده بود. پایین بودن این نسبت در تیمار 19 به‌احتمال خیلی زیاد به دلیل آبکافت و فعالیت زیاد آنزیم در محدوده pH=2 می‌باشد که به دنبال آن کوتاه‌شدن زنجیره‌های پلی‌پپتیدی پروتئین اتفاق می‌افتد و درنهایت جداسازی باندهای آمیدی به‌طور مؤثر انجام نشده است. در مطالعه‌ای که Matmaroh و همکاران (2011)، خصوصیات کلاژن محلول در اسید و کلاژن محلول در پپسین تهیه‌شده از بزماهی طلائی خال‌دار (*Parupeneus heptacanthus*) را بررسی کردند، نسبت جذب مشابهی بین بیشترین پیک آمید III و پیک $1450\ cm^{-1}$ برای ASC و PSC مشاهده شد. آن‌ها نتیجه گرفتند که ساختار مارپیچ سه‌گانه هلیکس در هر دو کلاژن وجود داشت.

نتایج آنالیز نقطه ذوب و نقطه بستن ژلاتین توسط آزمون روبش دمایی

رفتار مدول‌های ویسکوالاستیک تیمارهای استخراج‌شده به کمک آنزیم پپسین (تیمار 5، 17 و 19) و نمونه‌ای که به روش شیمیایی تهیه شده بود، در شکل6 و 7 نشان داده شده است. در دمای پایین‌تر از 20 درجه سانتی‌گراد، مدول ذخیره یا الاستیک (G') و مدول افت یا گرانروی (G") با افزایش دما کاهش پیدا کرده و مدول الاستیک بزرگ‌تر از مدول افت شده است (G' >G") که نشان‌دهنده این مسئله است که نمونه‌ها هنوز حالت ژله‌ای دارند (به‌استثناء تیمار 19 که ضعیف‌ترین قدرت ژلی را دارا بود). در دماهای تقریباً پایین‌تر از 20 درجه سانتی‌گراد بین نمونه تیمارهای استخراج‌شده به کمک آنزیم در مقایسه با نمونه استخراج‌شده به روش شیمیایی یعنی در تیمار 5 و تیمار 17، مدول الاستیک و مدول افت ازنظر مقدار عددی اندکی بیشتر از نمونه تهیه‌شده به روش شیمیایی می‌باشد. نقطه ذوب ژلاتین فیل‌ماهی به ترتیب در تیمارهای 5، 17 و نمونه تهیه‌شده به روش شیمیایی: 18/39، 15/78 و 16/23 درجه سانتی‌گراد بود. تیمار 19 به دلیل مقاومت بسیار پایین ژل در برابر حرارت خیلی سریع از هم گسسته شده و دارای نقطه ذوب معینی نبود. نقطه بستن ژل در ژلاتین فیل‌ماهی به ترتیب در تیمار 5، 17 و نمونه استخراج‌شده به روش شیمیایی: 9/78، 8/787 و 8/279 بوده است. لازم به ذکر است که تیمار 19 به دلیل گسستگی ساختار قادر به ایجاد ژل نبود.



شکل 6- عملکرد مدول ذخیره یا الاستیسیته (G') در روبش گرمایشی و سرمایشی



شکل 7- عملکرد مدول افت یا گرانروی (G") در روبش گرمایشی و سرمایشی

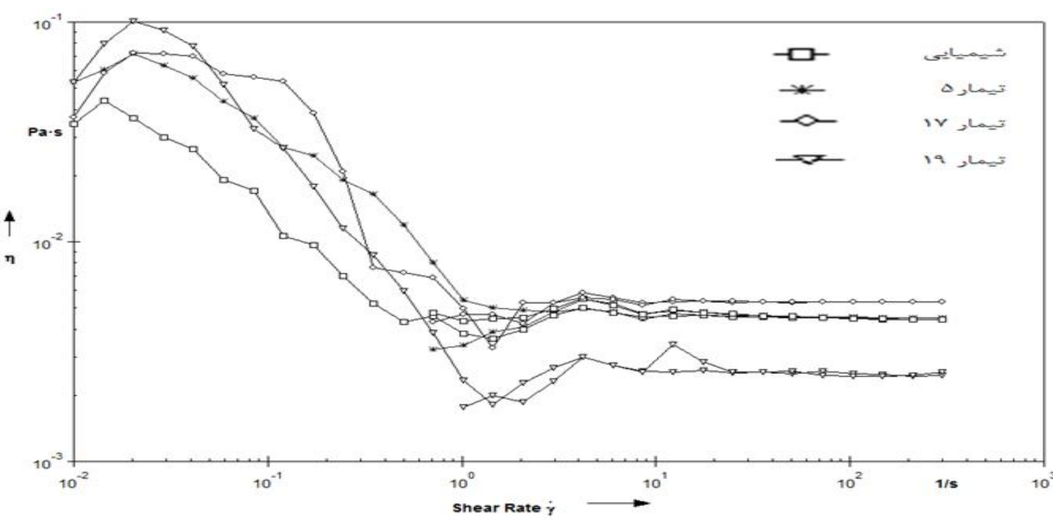
در پژوهش حاضر درواقع با افزایش نسبت آنزیم و pH و کاهش دما، مقدار عددی مدول الاستیک در دمای پایین‌تر از 20 درجه سانتی‌گراد در تیمار 5 و 17 نسبت به نمونه استخراج‌شده به روش شیمیایی اندکی افزایش یافت. اما در تیمار 19 مدول الاستیک و ویسکوز کمتر از تیمار 5، 17 و نمونه استخراج‌شده با روش شیمیایی شد یعنی با افزایش دما و کاهش pH و نسبت آنزیم مقدار عددی مدول الاستیک و ویسکوز کاهش یافت. این کاهش مدول الاستیک در تیمار 19 با زنجیره‌های پپتیدی بلندتر بخش جانبی پلیمر مرتبط است، زیرا این بخش‌ها طی کاهش دما نمی‌توانند با ایجاد اتصالات بین‌مولکولی به شکل مارپیچ سه‌تایی پایدار درآیند، به‌عبارتی‌دیگر ظرفیت بازسازی (رناتوراسیون) پایینی دارند. اما به‌تدریج با افزایش دما مدول ذخیره (G') تیمار 5 بزرگ‌تر از نمونه استخراج‌شده به روش شیمیایی شد، که نشان‌دهنده مقاومت دمایی نمونه استخراج‌شده به کمک آنزیم است. همچنین وقتی دما بیشتر افزایش پیدا کرد، هر دو

مدول ("G و 'G) به‌طور قابل‌توجهی کاهش پیدا کرده‌اند. خواص نقطه ذوب در ژلاتین فیل‌ماهی عمدتاً به فراکسیون‌های مولکولی در محدوده آلفا ارتباط دارد. نقطه ذوب در نمونه‌های ژلاتین با افزایش زنجیره آلفا افزایش یافته است (تیمار 5). درواقع الیگومرها با وزن مولکولی بالا توانایی بازسازی ژلاتین و تشکیل مجدد ساختارهای مارپیچی منظم و تثبیت و جهت‌گیری آب در کنار ماکرومولکول‌ها را نشان می‌دهند (Sims *et al*., 1997). درنتیجه کاهش انعطاف‌پذیری مولکول‌های ژلاتین، نقطه ذوب افزایش می‌یابد. در تیمار 5 به دلیل هیدرولیز پایین آنزیم پپسین در آن pH ساختار آلفا ژلاتین بیشتر حفظ شد و درنتیجه در دمای بالاتری ذوب شد (18/39 درجه سانتی‌گراد)، این مطالعه با نتایج مجتهدی و همکاران (1392)، که اثر زمان‌های مختلف پیش‌فراوری اسیدی و قلیایی بر ویژگی‌های ژلاتین پوست ماهی خاویار ایرانی بلوگا (*Huso Huso*) را بررسی کردند و دریافتند با افزایش زمان، حذف ناخالصی‌های نمونه‌های ژلاتین بیشتر و درنتیجه زنجیره آلفا و نقطه ذوب افزایش یافت، مطابقت داشت. در بررسی نقطه ذوب ژل باید به ترکیب ایمینواسیدی ژلاتین هم توجه داشت. حضور این دو اسیدآمینه (پرولین و هیدروکسی پرولین) باعث افزایش نقطه ذوب ژل می‌شود (Norland R, 1990). تیمار 19 به دلیل هیدرولیز بالای آنزیم در pH= 2 ساختار مارپیچ سه‌گانه خود را از دست داده است همان‌طور که در شکل 1 مشاهده شد زنجیره‌های آلفا در تیمار 19 به‌زحمت قابل‌رؤیت است و تقریباً از دست رفته است.

در روبش سرمایشی مدول الاستیک و مدول افت افزایش پیدا کردند و این افزایش تا زمانی است که "G و'G در بعضی نقاط همدیگر را قطع کرده‌اند ("G' =G). این نقطه یا نقاط در روبش سرمایشی (cooling scan) به‌عنوان نقطه بستن ژل تعریف شده است. در این مطالعه، نقطه بستن ژل به ترتیب برای تیمار 5، 17 و نمونه استخراج‌شده به روش شیمیایی 8/279، 8/787 و 9/78 درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

ویسکوزیته ظاهری

در شکل 8 نمودار ویسکوزیته ظاهری نمونه‌های استخراج‌شده به کمک آنزیم پپسین (تیمار 5، 17 و 19) در مقایسه با نمونه استخراج‌شده به روش شیمیایی نشان داده شد. در تمام نمونه‌های ژلاتین استخراج‌شده به کمک پپسین و با روش شیمیایی ابتدا یک شاخص تنش تسلیمی (افزایش ویسکوزیته در ابتدای نمودار) و سپس رفتار غیرنیوتنی از نوع رقیق‌شونده با برش قابل مشاهده است. درواقع در رفتار سودوپلاستیک، ویسکوزیته سیال وابسته به‌سرعت برشی بوده و با افزایش سرعت برشی کاهش پیدا کرده است. در رفتارهای غیرنیوتنی رابطه بین تنش و سرعت برش خطی نیست. ویسکوزیته غیرنیوتونی تیمارهای تهیه‌شده به روش آنزیمی (به‌جز تیمار 19) در مقایسه با نمونه تهیه‌شده به روش شیمیایی تقریباً در تمامی نرخ‌ها یا سرعت برشی بالاتر بوده است.



شکل 8- نمودار ویسکوزیته ظاهری نمونه‌های استخراج‌شده به کمک آنزیم پپسین، قوی‌ترین نمونه (تیمار 5)، تیمار مرکزی (تیمار 17) و ضعیف‌ترین نمونه (تیمار 19) و نمونه تهیه‌شده به روش شیمیایی.

درواقع برش باعث اختلال در ساختار نمونه می‌شود. افزایش ویسکوزیته در نرخ‌های برشی پایین نشان‌دهنده یک تنش تسلیمی ظاهری است (Rao and Kenny, 1999). Binsi و همکاران (2009) خواص عملکردی و رئولوژی ژلاتین استخراج‌شده از پوست

اسنپر چشم درشت و اثر آن بر توانایی تشکیل ژل گوشت چرخ شده ماهی را بررسی نمودند ویسکوزیته ابتدا به دلیل تنش برشی در نرخ‌های برشی پایینی افزایش یافت و سپس با افزایش نرخ برش ویسکوزیته شروع به کاهش کرد.

در مطالعه حاضر، با توجه به شیب کاهش ویسکوزیته (شکل 8) می‌توان دریافت که ویسکوزیته تیمار تهیه‌شده در دمای 30 درجه سانتی‌گراد و نسبت آنزیم 0/1% وزنی-وزنی و pH=4 (تیمار 5) دارای شیب کمتری نسبت به تیمار تهیه‌شده در دمای 50 درجه سانتی‌گراد و نسبت آنزیم 0/01 وزنی- وزنی و pH=2 (تیمار 19) و تیمار نقطه مرکزی تهیه‌شده در دمای 40 درجه سانتی‌گراد و نسبت آنزیم 0/055 وزنی-وزنی و pH= 3 (تیمار 17) می‌باشد. درواقع تیمار 5 در برابر نرخ برش به دلیل توانایی در حفظ ساختار خود در سرعت‌های برشی بالا مقاومت بیشتری در برابر برش نسبت به تیمار 19 و 17 نشان داده است. در صورتی‌که تیمار 19 درحالیکه در ابتدا در نرخ‌های برشی پایین مقاومت نسبتاً زیادی از خود نشان داد اما در نرخ‌های برشی بالاتر، با سرعت بیشتری ساختار خود را از دست داده و نمودار آن دارای شیب تندتری می‌باشد. همچنین باید متذکر شد که نمونه تهیه‌شده در نقطه مرکزی (تیمار 17) نسبت به تیمار 19 دارای ویسکوزیته بالاتری بوده و در نرخ‌های برشی بالا نسبت به تیمار 19 توانسته مقاومت بیشتری از خود نشان داده و درنتیجه نمودار آن شیب کندتری را دارا است. نمونه تهیه‌شده به روش شیمیایی دارای ویسکوزیته بیشتری نسبت به تیمار 19 بوده ولی نسبت به تیمار 5 و17 دارای ویسکوزیته پایین‌تری می‌باشد. این بدین معناست که نمونه‌های تهیه‌شده به روش آنزیمی (به‌جز تیمار 19) در طول برش توانسته‌اند ساختار خود را بیشتر حفظ نموده و روند کاهش ویسکوزیته آن‌ها کندتر بوده است. بیشترین میزان شیب نمودار ویسکوزیته به ترتیب در تیمار 19، تیمار تهیه‌شده به روش شیمیایی، تیمار 17 و سپس تیمار 5 قابل‌رؤیت می‌باشد (شکل 8).

نمونه تهیه‌شده در pH بالا به دلیل فعالیت پایین آنزیم در این pH دارای میزان کمتر هیدرولیز و کوتاه شدن زنجیره‌های پلی‌پپتیدی بوده و نمونه حاصله دارای قدرت ژل و ویسکوزیته بیشتری بود (تیمار 5). درصورتی‌که در تیمار 19 (ضعیف‌ترین) به دلیل هیدرولیز بالای ژلاتین در pH= 2 و درنتیجه کوتاه شدن و تخریب ساختار ژل در برابر برش مقاومت کمتری داشته و سریع‌تر تخریب می‌شود. این نتیجه با نتایج دامرونگ ساکول (2008) که دریافتند با افزایش pH میزان اثر هیدرولیز آنزیم پاپائین بر روی زنجیره استخراجی کاهش یافته و درنتیجه استحکام ژل و ویسکوزیته بهبود می‌یابد، مطابقت داشت. همچنین با افزایش دما ویسکوزیته کاهش پیدا می‌کند (مرتضوی و همکاران، 1387). پس می‌توان نتیجه گرفت ازآنجایی‌که تیمار 19 و نمونه تهیه‌شده به روش شیمیایی در دمای 50 درجه سانتی‌گراد استخراج‌شده در صورتی‌که تیمار 5 و 17 به‌ترتیب در دماهای 30 و 40 درجه سانتی‌گراد تهیه شده‌اند، دارای ویسکوزیته کمتری هستند.

هنگامی‌که میزان پروتئین‌هایی با وزن مولکولی بالا (همچون زنجیره β) در ژلاتین پایین باشد مقدار ویسکوزیته نیز کاهش می‌یابد (مجتهدی و همکاران، 1392). ژلاتین تهیه‌شده به روش شیمیایی دارای نسبت پایینی از زنجیره‌های β می‌باشد، همچنین دارای ویسکوزیته کمتری نسبت به تیمار 5 (نمونه قوی‌ترین) و تیمار 17 (نقطه مرکزی) تهیه‌شده به روش آنزیمی است (شکل 8). از این‌رو باید توجه داشت که تنوع طبیعی در ویسکوزیته می‌تواند به علت تفاوت در گوناگونی ماهی، محیط‌زیست، همچنین روش استخراج باشد (Shyni et al., 2014).

منابع

مجتهدی،م. معتمد زادگان،ع. چگین،ف، 1392، اثر زمانهای مختلف پیش فرآوری اسیدی و قلیایی بر ویژگی‌های ژلاتین پوست ماهی خاویار ایرانی بلوگا (*Huso huso*). بیست و یکمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی ایران، آبان 1392.

مرتضوی،ع. مهجوریان نماری،ع. معتمد زادگان،ع، 1387، بررسی خصوصیات رئولوژیکی ژلاتین فیل ماهی ایرانی(بلوگا استورژن). هجدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی ایران، مهر 1387.

Abe, Y. and Krimm, S. (1972). Normal vibrations of crystalline polyglycine I. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 11(9), 1817-1839.

Ahmad, M. and Benjakul, S. (2010). Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monocerous*). *Food Chemistry* 120(3):817-824.

Al-Saidi, G., Al-Alawi A., Rahman, M. and Guizani N. (2012). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of extracted gelatin from shaari (*Lithrinus microdon*) skin: effects of extraction conditions.

Asher, D. (1999). The transmissible spongiform encephalopathy agents: concerns and responses of United States regulatory agencies in maintaining the safety of biologics. *Developments in biological standardization*, 100, 103-118.

Bailey, A.J., Paul, R.G. & Knott L. (1998). Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mechanisms of ageing and development*, 106(1-2), 1-56.

Benjakul, S., Oungbho, K., Visessanguan, W., Thiansilakul, Y. and Roytrakul S. (2009). Characteristics of gelatin from the skins of bigeye snapper, Priacanthus tayenus and Priacanthus macracanthus. *Food Chemistry*, 116(2), 445-451.

Binsi, P., Shamasundar, B., Dileep, A., Badii, F. and Howell N. (2009). Rheological and functional properties of gelatin from the skin of Bigeye snapper (*Priacanthus hamrur*) fish: Influence of gelatin on the gel-forming ability of fish mince. *Food Hydrocolloids*, 23(1), 132-145.

Damrongsakkul, S., Ratanathammapan, K., Komolpis, K. and Tanthapanichakoon, W. (2008). Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase. *Journal of industrial and Engineering Chemistry*, 14(2), 202-206.

Doyle, B.B., Bendit, E. and Blout E.R. (1975). Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 14(5), 937-957.

Feng, W., Zhao, T., Zhou, Y., Li, F., Zou, Y., Bai, Sh., Wang, W., Yang, L., Wu X. (2013). Optimization of enzyme-assisted extraction and characterization of collagen from Chinese sturgeon *(Acipenser sturio Linnaeus)* skin. *Journal of Pharmacogn Mag*, 9, 32–37.

Gilsenan, P. and Ross-Murphy, S. (2000). Rheological characterisation of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloids*, 14(3), 191-195.

Jridi, M., Nasri, R., Salem, R.B.S.-B., Lassoued, I., Barkia A., Nasri M. and Souissi N. (2015). Chemical and biophysical properties of gelatins extracted from the skin of octopus (*Octopus vulgaris*). *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 881-889.

Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. and Shahidi, F. (2010). Isolation and characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). *Food Chemistry*, 119(4), 1519-1526.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680.

Li, H., Liu, B., Gao, L. and Chen, H. (2004). Studies on bullfrog skin collagen. *Food Chemistry* 84(1), 65-69.

Matmaroh, K., Benjakul, S., Prodpran, T., Encarnacion, A.B. and Kishimura, H. (2011). Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food Chemistry*, 129(3), 1179-1186.

Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Kishimura, H. 2007. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 104(2):593-601.

Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Kishimura, H. (2008). Improvement of gelatin extraction from bigeye snapper skin using pepsin-aided process in combination with protease inhibitor. *Food hydrocolloids*, 22(4), 615-622.

Norland, R. (1990). Fish gelatin. *Advances in fisheries technology and biotechnology for increased profitability*, 325-333.

Norziah, M., Al-Hassan, A., Khairulnizam, A., Mordi M. and Norita M. (2009). Characterization of fish gelatin from surimi processing wastes: Thermal analysis and effect of transglutaminase on gel properties. *Food hydrocolloids*, 23(6), 1610-1616.

Payne, K. and Veis, A. (1988). Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 27(11), 1749-1760.

Plepis, A. M. D. G., Goissis, G., & Das, Gupta, D. K. (1996). Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen. *Polymer Engineering and Science*, 36(24), 2932–2938.

Rao, M. and Kenny, J. (1975). Flow properties of selected food gums. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 8(3), 142-148.

Sai, K.P. and Babu, M. (2001). Studies on Rana tigerina skin collagen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 128(1), 81-90.

Shyni K., Hema G., Ninan G., Mathew S., Joshy C. and Lakshmanan P. (2014). Isolation and characterization of gelatin from the skins of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), dog shark (*Scoliodon sorrakowah*), and rohu (Labeo rohita). *Food Hydrocolloids*, 39, 68-76.

Sims, T., Bailey, A. and Fieldt, D. (1997). The chemical basis of molecular weight differences in gelatins. *The Imaging Science Journal*, 45(3-4), 171-177.

Tong, Y. and Ying, T. (2013). Gelling strength improvement and characterization of a gelatin from scales of bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 11(1), 146-150.

Yang, H., Wang, Y., Jiang M., Oh, J.H., Herring J. and Zhou P. (2007). 2-Step optimization of the extraction and subsequent physical properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin gelatin. *Journal of Food Science*, 72(4), C188-C195.

Zhao, L., Budge, S., Ghaly, A., Brooks, M. and Dave, D. (2011). Extraction, purification and characterization of fish pepsin: a critical review. *Journal of Food Process Technol*, 2(6), 2-6.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 16, No. 1, Apr. May. 2020, p. 157- 170

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 16، شماره 1 ،فروردین -اردیبهشت 1399 ص.170-157

A Comparative study on Physio-Chemical Properties of Recovered Gelatin from Beluga (*Huso huso*) fish skin by Enzymatic and Chemical Methods

Z. Eskandari[1], A. Jafarpour[*2]

Received: 2018.12.17
Accepted: 2019.09.22

Introduction: Gelatin is a water-soluble protein mixture that is obtained by partial hydrolysis of collagen, which forms the major protein in bones, cartilage, and skin. Gelatin is made from collagen fibers, which is low in protein, cholesterol, fat and carbohydrates, with a special positive effect on human health. Gelatin is one of the most notable natural biopolymers, the most important source of this hydrocolloid is pig. Trying to find suitable gelatin supplements for food products is increasing. Fish gelatin is one of the most suitable mammalian gelatinous substitutes and is accepted as a Halal (Kosher) food item. The purpose of this study was to extract gelatin from sturgeon Beluga skin using pepsin enzyme and then investigate the effect of the enzyme on the improvement of physiochemical and its functional properties in comparison to the gelatin extracted by chemical method.

Material and Methods: *Pre-treatment and extraction of gelatin and application of factors*
Skin Preparation was performed according to Feng et al. (2013) with slight changes in pre-treatment steps. A solution of 3.5% NaCl was used to remove non-collagenic proteins and 0.5% sodium carbonate solution (Na_2CO_3) to remove lipid from the skin. The initial pretreatment was carried out with a solution of 3.5% sodium chloride at a rate of 1:10 w / v at a speed of 180 rpm for 6 hours which was replaced every 3 hours with the water. Extraction by was carried out following Tong et al. (2013) method. Gelatin was obtained from pre-treated skin in distilled water at temperature of 30, 40 and 50 degrees Celsius and a percentage of enzymes (0.01, 0.055 and 0.1) at different pH (2, 3 and 4) for 6 hours and 45 minutes in hot water bath. Then, the mixture was kept in the boiling water bath, for 5 minutes to inactivate the enzyme. The solution was passed through a cleaning cloth and then centrifuged at 3500 rpm for 20 min and finally was lyophilized in a freeze-drier. In this research, the Response surface methodology response (RSM) method was used to optimize the experimental treatments. The central composite rotatable design was used to optimize the gelatin enzyme extraction process.

Results and Discussion: The α chains were clearly visible in the sample extracted by the enzyme, with molecular weight of 130 kDa (treatment 5), while the α2 chain is much weaker in the extracted gelatin by chemical method. By decreasing enzyme ratios, chains with molecular weights of less than 130 kDa disappeared gradually in chemical samples as well as in an enzyme-extracted sample (treatment 19). The gelatin extracted by the enzymatic method contains α1 and α2 chains. In the average amount of enzyme (treatment 17), the α2 chains were relatively weaker than the maximum value of the enzyme (treatment 5), and these chains almost disappeared in the minimum amount of enzyme (treatment 19). These chains are weaker in the chemical extracted gelatin than that of treatment 5. Moreover, it can be seen that in the gelatin extracted by the enzymatic method, the ratio of the α2 / α1 chain is about 2 (the intrinsic ratio in collagen I), which shows that the inherent structure of gelatin is preserved.

The highest and lowest amidic wavelength A was obtained for treatment 17 and treatment 19, the highest and lowest wavelength amide I for treatment 5 and treatment 19, the highest and lowest amid II wavelengths for chemical extracted treatments and treatment 17, The highest and lowest ratio of amide III to amide 1454 is related to treatments 5 and 19, and the highest and lowest amount of amide B is related to treatment 19 and 5.

The behavior of the viscoelastic modulus of the treatments extracted with the pepsin enzyme (treatment 5, 17 and 19) and the chemically prepared sample showed that at temperatures lower than 20 ° C the storage or elastic modulus (G ') and the loss or viscous modulus (G') decreased with increasing temperature and the elastic modulus was larger than the loss modulus (G' >G") indicating that the samples are still jelly-like (with the exception of treatment 19 that had the weakest gel strength).

In all gelatin samples extracted using pepsin and chemical method, first, a relaxation stress index (viscosity increase at the beginning of the graph), and then a thinning non-Newtonian behavior (pseudo-plastic) was obvious during the

1 M.Sc Graduate, Fisheries Department, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari-Iran.
2 Associate Professor, Fisheries Department, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari-Iran.
(* Corresponding author email address: a.jafarpour@sanru.ac.ir)

shear rate. In fact, in the behavior of pseudo-plastic, the viscosity of the fluid is related to the shear rate and has decreased with increasing shear rate. Non-Newtonian viscosity of treatments prepared by the enzymatic method (except treatment 19) was higher than that of the chemically prepared sample at different applied shear rate.

Keywords: Enzymatic extraction, Gelatin, *Huso huso*, SDS-PAGE, FTIR, Rheological behaviors